

一株黄曲霉拮抗细菌 F1 的筛选、鉴定及其抑菌特性

饶胜其, 陈素雅, 高璐, 尹永祺, 杨振泉, 方维明

(扬州大学食品科学与工程学院, 江苏扬州 225127)

摘要: 为获得能有效抑制食品原料中黄曲霉生长的生防细菌, 本研究以乳酸菌发酵制品和香辛料为筛菌出发样品, 通过菌株分离、初筛和复筛, 从黑胡椒中筛选到一株对黄曲霉有强烈抑制作用的菌株 F1。依据菌株的形态特征、培养特征、生理生化特征结合 16S rDNA 基因序列分析、系统发育树构建来鉴定菌株, 最终确定菌株 F1 为解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* (保藏编号: CGMCC No. 10942), 与已商品化的生防菌 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 的亲缘关系最为接近。菌株 F1 的发酵上清液经过超滤处理以及蛋白酶酶解试验和稳定性试验, 结果显示, 菌株 F1 的抑菌成分为分子量 30 ku~100 ku 的蛋白类物质; 在 100 °C 处理 30 min 后仍能保持 87.43% 的抑菌活性; 在 pH 值 3.0~10.0 范围内其相对抗菌活性均在 70% 以上。研究表明, 从黑胡椒中分离到的解淀粉芽孢杆菌 F1 能够通过代谢产生稳定性较强的抗菌蛋白而达到拮抗黄曲霉的目的, 在食品领域具有一定的应用前景。

关键词: 黄曲霉; 乳酸菌; 解淀粉芽孢杆菌; 抑菌特性

文章编号: 1673-9078(2015)12-99-105

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.015

Screening, Identification, and Antifungal Properties of a Bacterial Strain

F1 with Antagonistic Activities Against *Aspergillus flavus*

RAO Sheng-qi, CHEN Su-ya, GAO Lu, YIN Yong-qi, YANG Zhen-quan, FANG Wei-ming

(School of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: To obtain a biocontrol bacteria that can effectively suppress the growth of *Aspergillus flavus* in raw food materials, products fermented by lactic acid bacteria and spices were used as the starting materials. One strain, F1, was screened from black pepper through strain isolation, preliminary screening, and re-screening, and showed a strong inhibitory effect towards *Aspergillus flavus*. This strain was identified based on morphological, cultural, physiological, and biochemical characteristics, and the 16s rDNA analysis followed by phylogenetic tree construction, to be *Bacillus amyloliquefaciens* (Preservation number: CGMCC No. 1094). The strain had a close genetic relationship with the commercialized biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. The culture supernatant of strain F1 was subjected to ultrafiltration treatment, enzymatic hydrolysis test, and stability test. The results implied that the antifungal component of strain F1 was protein substances with molecular weights of 30 ku~100 ku. About 87.43% of the antifungal activity remained after the treatment at 100 °C for 30 min, and over 70% of antifungal activity remained when the pH was in the range of 3.0~10.0. This study suggests that the strain *Bacillus amyloliquefaciens* F1, isolated from black pepper, can produce relatively stable antifungal proteins through metabolism, and, thus, present an antagonistic effect on *Aspergillus flavus*. Therefore, this strain has the potential for application in food products.

Key words: *Aspergillus flavus*; lactic acid bacteria; *Bacillus amyloliquefaciens*; antifungal properties

黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 是一种常见的霉菌, 是子囊菌亚门 (*Ascomycotina*)、曲霉属 (*Aspergillus*) 一种常见的腐生型好氧真菌, 不仅污染食品和饲料,

收稿日期: 2015-05-26

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目(2012BAD36B02); 国家自然科学基金资助项目(31271945); 江苏省自然科学基金项目(BK20140479); 江苏省高校自然科学面上项目(12KJD550007)

作者简介: 饶胜其(1981-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品微生物与生物技术

通讯作者: 方维明(1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品深加工及食品生物技术

而且可引起人类和动物的多种疾病^[1-2]。黄曲霉的次生代谢产物黄曲霉毒素具有很强的毒性, 研究报道其具有致癌性、致突变、致畸性, 降低免疫力, 并可引起肝部损伤等危害^[3-5]。据统计调查, 全球因农作物和农产品遭受霉菌及其毒素污染而造成的直接或间接经济损失达到数百亿美元^[3], 甚至出现死亡事件^[6]。可见, 黄曲霉及其毒素的危害必须引起人们的重视。越来越多的研究发现, 某些细菌, 包括乳酸杆菌和芽孢杆菌, 可抑制霉菌的生长及其产毒, 在防治黄曲霉及其毒素污染方面显现出广阔的应用前景。乳酸菌是一种广泛分布于自然界而且普遍应用于食品、医药、饲料等领

域的益生菌, 发酵过程中可以产生有机酸、过氧化氢、双乙酰、蛋白类物质、罗伊氏菌素、脂肪酸、环肽等多种抗真菌物质^[7]。Gourama 和 Bullerman^[8]发现, 嗜酸乳酸杆菌、保加利亚乳酸杆菌和植物乳酸杆菌可抑制寄生曲霉的孢子萌发。马镭等^[9]从荔枝果实发酵液中分离鉴定了一株植物乳杆菌, 能有效拮抗荔枝霜疫霉菌, 研究显示其在荔枝生物保鲜上具有良好的应用前景。许多研究发现, 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)在生长过程中可以产生一系列抑制真菌和细菌活性的代谢物, 已证实的抑菌物质包括抑菌蛋白类、脂肽类抗生素、大环类酯类、肽类、聚酮化合物等, 在抑制病原菌、环境保护、动物生产等方面已显示出益生菌的用途^[10-15]。

本研究选取我国四川省本地产泡菜母水、市售酸奶、发酵肉制品和多种香辛料为分离菌来源, 以从黑胡椒表面分离出的产毒黄曲霉为指示霉菌, 通过平板划线分离、初筛和复筛, 从黑胡椒中分离鉴定出一株能有效拮抗黄曲霉的解淀粉芽孢杆菌 F1 (保藏编号: CGMCC No. 10942), 并对其抑菌特性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 含菌样品

红花椒、青花椒、黑胡椒、肉桂、八角、白胡椒、辣椒, 来源于四川雅安、自贡市; 泡菜母水, 四川雅安市; 市售酸奶、火腿, 扬州乐购超市。

1.1.2 菌株

产毒黄曲霉, 由扬州大学食品微生物发酵实验室从海南黑胡椒体表分离纯化所得。

1.1.3 主要试剂

CTAB、蛋白酶 K、胰蛋白酶 (1:250)、溶菌酶、RNA 酶、dNTP、Taq 酶, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 碱性蛋白酶 (>10 万 U/g), 上海蓝季科技发展有限公司 DNA Marker 2000, 宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.1.4 主要仪器设备

ZHJH-C1209B 型垂直流超净工作台, 上海智诚分析仪器制造有限公司; GHX-92708-1 型隔水式恒温培养箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; TG-16WS 台式高速离心机, 湘仪离心机仪器有限公司; SS-325 高压蒸汽灭菌锅, 日本 TOMY 公司; S 4800 扫描电镜, 日本日立公司; CX41R 生物显微镜, 日本 Olympus 公司; 2720 Thermal Cycle PCR 仪, 美国 Applied

Biosystems 公司; 紫外凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司。

1.1.5 培养基

MRS 固 (液) 体培养基; PDA 固 (液) 体培养基; 营养琼脂培养基; 营养肉汤培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 试样中细菌的分离与纯化

超净台中, 将固体样品红花椒、青花椒、黑胡椒、肉桂、八角、白胡椒、辣椒和火腿剪碎或捣碎, 而市售酸奶和泡菜母水则直接取样, 分别称取 5 g 于 45 mL 无菌生理盐水中并充分振荡 30 min, 10 倍稀释法处理, 选取适宜的稀释浓度, 营养琼脂培养基涂布, 37 °C 条件下培养 24~48 h 后菌落计数。挑取单菌落三区划线法纯化细菌, 传代三次后编号保种。

1.2.2 乳酸细菌的分离与纯化

市售酸奶与泡菜直接取生理盐水稀释, 市售火腿样品处理同 1.2.1, 选取适宜的稀释浓度, 含 2% CaCO₃ MRS 琼脂培养基涂布, 37 °C 厌氧条件下培养 24~48 h 后挑取有溶钙圈的单菌落三区划线纯化细菌, 传代三次后编号保种。

1.2.3 霉菌拮抗菌的筛选

1.2.3.1 初筛

将 1.2.1 中分离并保种的细菌, 4 °C 解冻, 吸取 100 μL 菌液于 5 mL 营养肉汤或 MRS 肉汤中培养活化后接种转接至平板培养基上继续培养 24 h 至长出单菌落, 下层平板底部用油性笔和直尺划线, 长度 3 cm, 间隔 2 cm, 倒平板, 挑取检测菌的单菌落, 乳酸菌按照已划好的直线穿刺接种于固体 MRS 平板培养基上, 其他细菌穿刺接种于营养肉汤培养基上, 培养 24~36 h 后, 长出菌斑, 保留待用。取黄曲霉孢子悬液 (浓度为 10⁵ 个/mL) 适量, 与经融化后保温的 PDA 半固体培养基混匀 (孢子终浓度为 10⁴ 个/mL) 后立即倒至上述划线平板上, 每个平板倒 5 mL, 冷却后在 28 °C 下培养, 每株菌做三个平行, 每隔 12 h 观察抑菌结果, 记录垂直于菌株划线方向的抑菌区直径, 以此作为抑菌效果。

1.2.3.2 复筛

倾注平板法: 将 1.2.1 中分离并保种的细菌, 4 °C 解冻, 吸取 100 μL 菌液于 5 mL 营养肉汤或 MRS 肉汤中培养活化, 24 h 后取菌液 6000 r/min 离心 10 min, 0.22 μm PES 水系滤膜过滤除菌收集上清液。吸取 1 mL 无菌上清液倾注至无菌平板内, 倒入 10 mL PDA 培养基轻轻混匀, 待培养基冷却凝固, 用直径为 6 mm 打孔器在中央打孔, 向孔中注入 20 μL 浓度为 10⁴ 个

/mL 的黄曲霉孢子悬液, 空白培养基代替上清液作为对照, 30 °C 培养 3 d 后测霉菌直径, 每组三个平行, 以抑菌率 (%) 为拮抗细菌上清液的抑菌效果, 抑菌率的计算公式为:

$$\text{抑菌率}(\%) = (\text{对照组直径} - \text{试验组直径}) \times 100 / \text{对照组直径}$$

1.2.4 拮抗菌菌株的鉴定

1.2.4.1 拮抗菌菌株形态及生理生化鉴定

菌株形态特征鉴定: 观察的菌落形状、菌落大小、隆起形状、边缘、表面颜色、透明度、革兰氏染色情况, 菌体细胞形态等。

菌株微观形态特征观察: 新鲜培养的菌液离心收集菌体后用生理盐水清洗, 5% 戊二醛固定过夜, 乙醇梯度脱水, 点样, 镀膜, 上镜观察。

菌株生理生化鉴定: 用细菌微量生化发酵管对所筛菌株进行生化鉴定, 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》对所筛菌株进行生理生化鉴定。

1.2.4.2 16S rDNA 序列分子生物学鉴定

采用 CTAB 法提取菌株 F1 的基因组 DNA, 并以其为模板, 采用通用引物 (16S rDNA-F:5'-AGA GTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 (16S rDNA-R:5'-AAG GAGGTGATCCAACCGCA-3') 进行 PCR 扩增后, 取适量扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 使用切胶回收试剂盒回收目的片段, 送生工生物工程 (上海) 有限公司进行测序; 将测序序列在 GenBank 上进行 blast 比对并作同源性分析, 将测序结果与近似种属代表株 16S rDNA 序列用 Clustal X 进行序列排序后, 使用 MEGA5 软件进行聚类分析, 并采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 其中 Bootstraps 为 1000。

1.2.5 *B. amyloliquefaciens* F1 发酵液及其超滤液的抑菌特性

取 *B. amyloliquefaciens* F1 接种入优化后的培养基 (0.4% 蔗糖、0.2% 柠檬酸铵、0.02% 硝酸钾, 初始 pH 值 5.5) 中, 32 °C, 发酵培养 48 h, 8000 r/min 离心 20 min, 取上清液过 0.22 μm 水系滤膜, 移取无菌上清液 15 mL 于膜截留分子量分别为 100 ku、30 ku、3 ku 的超滤离心管内, 离心收集各超滤滤过液, 统一定容至 15 mL, 分别测定各收集液对不同霉菌的抑菌活性, 未经超滤膜过滤的无菌上清液为对照。

1.2.6 抗菌超滤液稳定性

1.2.6.1 抗菌超滤液对热的稳定性

取 1.2.4 中获得的含分子量 30~100 ku 抗菌物质的超滤液, 在 30 °C、50 °C、70 °C、100 °C 和 121 °C 的温度下处理 30 min 后, 检测其抑菌活性, 对照为未经处理的超滤液。

1.2.6.2 抗菌超滤液对酸和碱的稳定性

取 1.2.4 中获得的含分子量 30~100 ku 抗菌物质的超滤液, 调节 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 并保持 30 min 后, 重新调节至初始 pH 值, 检测其抑菌活性, 对照为未经处理的超滤液。

1.2.6.3 蛋白酶对超滤液的抗菌活性影响

取 1.2.4 中获得的含分子量 30~100 ku 抗菌物质的超滤液, 分别加入蛋白酶 K (终浓度 0.1 mg/mL)、胰蛋白酶 (调节初始 pH 值为 8.0, 终浓度 0.01 mg/mL)、碱性蛋白酶 (调节初始 pH 值为 10.0, 终浓度 1 mg/mL), 37 °C 酶解 1 h 后, 95 °C 水浴灭酶 15 min, 再将酶解后的超滤液再调至原始 pH, 检测其抑菌活性, 对照为未经处理的超滤液。

1.2.7 数据统计分析

采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析, 用 Duncan's 多重分析进行组间显著性检验, 显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 细菌分离纯化

采用微生物学方法, 从原材料中分离纯化到 223 株菌, 其中 80 株细菌来源于香辛料, 143 株乳酸细菌来自于泡菜和酸奶、火腿中。

2.2 黄曲霉拮抗菌初筛结果

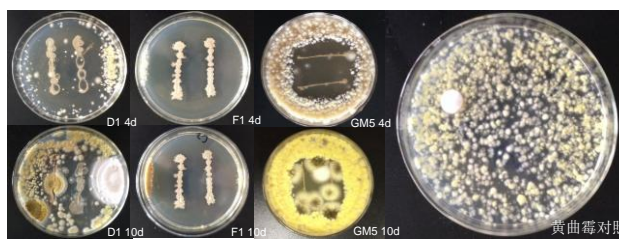


图 1 部分菌株对黄曲霉的抑制作用

Fig.1 Antagonistic activity against *Aspergillus flavus* by some of the bacteria isolates

经初筛, 从 223 株细菌中分离筛选到对黄曲霉有较强抑制作用的菌株 31 株, 抑菌区直径在 1~2 cm 之间的有 18 株, 在 2~3 cm 之间的有 13 株, 其中 9 株来自于香辛料分离菌, 且全部为产芽孢杆菌, 另外 22 株主要来自泡菜母水和香肠中的乳酸菌 (表 1)。从抑菌试验结果来看, 多数乳酸菌对黄曲霉有较强抑制作用, 但随着培养时间的延长, 乳酸菌的抑霉性减弱, 黄曲霉菌丝逐渐向原先的抑菌区蔓延, 且易被其他霉菌污染 (见图 1 中的 GM5 菌株), 而部分香辛料来源菌的抑菌区在培养 14 d 后依然无孢子萌发 (见图 1 中

的 F1 菌株)。综上, 选择从香辛料中筛选出的 9 株细菌进行复筛。

表 1 对黄曲霉有较强抑制作用的菌株及来源

Table 1 Strains with relatively strong antagonistic activities on

Aspergillus flavus and their sources

菌株编号	抑菌区直径/cm	初步鉴定	分离株来源
A2	2.04±0.18	乳酸菌	泡菜母水
A6	1.31±0.41	乳酸菌	泡菜母水
A9	1.01±0.66	乳酸菌	泡菜母水
A12	2.11±0.58	乳酸菌	泡菜母水
A16	1.53±0.43	乳酸菌	泡菜母水
B4	1.24±0.67	乳酸菌	香肠
B18	1.47±0.14	乳酸菌	香肠
C2	2.43±0.24	芽孢杆菌	白胡椒
C7	1.80±0.43	芽孢杆菌	白胡椒
D1	2.03±0.22	芽孢杆菌	肉桂
D2	1.65±0.36	乳酸菌	香肠
D3	1.36±0.49	乳酸菌	香肠
D4	1.60±0.35	乳酸菌	香肠
D5	2.14±0.33	乳酸菌	香肠
E3	1.60±0.59	乳酸菌	泡菜母水
E8	2.37±0.31	乳酸菌	泡菜母水
E16	1.24±0.23	乳酸菌	泡菜母水
E27	1.74±0.10	乳酸菌	泡菜母水
F1	2.84±0.28	芽孢杆菌	黑胡椒
F2	2.13±0.27	芽孢杆菌	黑胡椒
F3	2.38±0.15	芽孢杆菌	黑胡椒
F4	2.42±0.19	芽孢杆菌	黑胡椒
F10	2.33±0.08	芽孢杆菌	黑胡椒
G5	2.12±0.14	芽孢杆菌	辣椒
GM1	1.03±0.11	乳酸菌	泡菜母水
GM4	1.01±0.43	乳酸菌	泡菜母水
GM5	2.09±0.60	乳酸菌	泡菜母水
GM15	1.12±0.06	乳酸菌	泡菜母水

注: 为受试菌株与黄曲霉共培养 48h 的抑菌效果。

2.3 黄曲霉拮抗菌复筛结果

采用倾注平板法, 比较初筛到的 9 株拮抗菌对黄曲霉抑制能力, 结果如表 2, 发现编号为 F1 菌株的抑制能力显著($p<0.01$)高于其他 8 株细菌, 其对黄曲霉的抑制能力达到 58.82%, 因此选择 F1 为研究目的菌株。

2.4 黄曲霉拮抗菌 F1 的鉴定

2.4.1 形态及生理生化特性鉴定

将筛选出的拮抗菌 F1 先在营养肉汤培养基 37 °C 培养 24 h, 可观察到有菌膜产生; 后在营养肉汤固体培养基上进行划线培养, 37 °C 培养 48 h 后观察, 菌落较大约 6.0 mm, 表面膜状有褶皱, 侧面高凸起, 幼龄菌挑起十分粘稠, 随着培养时间的增加, 菌落分散成雪花状, 灰白色不透明; 经革兰氏染色后在生物显微镜下观察, 菌体为紫色阳性, 短杆状, 内生芽孢; 透射电镜下可清晰地看到菌体呈典型的棒状杆菌, 大小约 30 μm, 单生, 有鞭毛 (图 2)。

表 2 9 株芽孢杆菌对黄曲霉的抑制作用及其来源

Table 2 Antagonistic activities of nine strains of *Bacillus* against

Aspergillus flavus and their sources

菌株编号	抑菌率/%	分离样品来源
C2	30.62±1.02 ^{dD}	白胡椒
C7	15.61±0.56 ^{fF}	白胡椒
D1	22.03±0.40 ^{eE}	肉桂
F1	58.82±0.38 ^{aA}	黑胡椒
F2	22.03±0.57 ^{eE}	黑胡椒
F3	30.10±0.82 ^{dD}	黑胡椒
F4	38.82±0.36 ^{bB}	黑胡椒
F10	35.94±1.08 ^{cC}	黑胡椒
G5	21.73±0.85 ^{eE}	辣椒

注: 表中数据为三次平均结果, 表示为平均值±标准差。

不同小写字母表示菌株间的差异显著 ($p<0.05$), 不同大写字母表示菌株间的差异极显著 ($p<0.01$)。

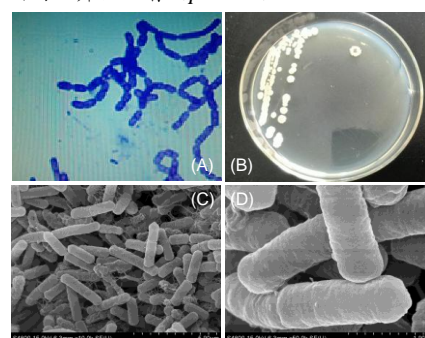


图 2 菌株 F1 菌落形态及微观结构

Fig.2 Colony morphology and microstructure of the F1 strain

注: 图 A: F1 革兰氏染色; 图 B: F1 平板培养单菌落; 图 C: F1 扫描电镜图 (放大 10K 倍); D: F1 扫描电镜图 (放大 50K 倍)。

菌株 F1 生理生化反应结果表明: 不产生吲哚, V-P 试验、甲基红试验均为阳性; 氧化酶、接触酶、淀粉酶、卵磷脂酶亦均为阳性; 糖发酵试验结果为, 不能利用甘露醇和乳糖, 可发酵麦芽糖、蔗糖、葡萄糖但不产气, 结果见表 2。对菌株 F1 进行生长特性研究, 获得其最适生长温度为 25~32 °C, 最高可耐受 45 °C 高温, 最低可耐受 20 °C。可生长 pH 值为 5.0~8.0,

最适生长 pH 为 5.5。耐盐性试验表明, 菌株可在低于 10% 氯化钠浓度的培养基中生长, 最适生长盐浓度为 5%。结果见表 3。

表 3 菌株 F1 生理生化鉴定结果

Table 3 Physiological and biochemical identification results from the F1 strain

鉴定项目	鉴定结果	鉴定项目	鉴定结果
V-P	-	甘露醇	-
吡啶	-	麦芽糖	+
甲基红	+	乳糖	-
氧化酶	+	葡萄糖	+
接触酶	+	蔗糖	+
淀粉酶	+	最适温度	32°C
卵磷脂酶	+	最适 pH	5.5
		最适盐浓度	5%

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性。

依据《伯杰氏细菌鉴定手册》, 结合拮抗菌 F1 的生理生化特征、生长特性和该菌株的菌落及菌体特征, 初步鉴定出该菌为芽孢杆菌属。

2.4.2 分子生物学鉴定

采用 CTAB 法提取芽孢杆菌 F1 基因组 DNA, 提取出的基因组 DNA 完整无断裂 (图 2a)。采用 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 得到约 1500 bp 的特异性扩增产物 (图 2b)。

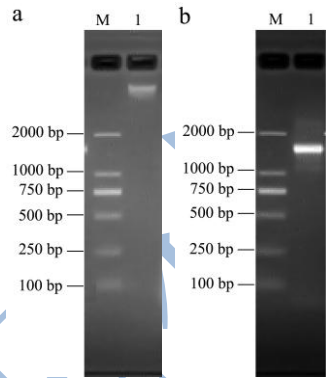


图 3 菌株 F1 基因组 DNA 凝胶电泳图 (a) 和菌株 F1 16S rDNA 序列的 PCR 扩增产物电泳图 (b)

Fig.3 Electrophoresis profiles of DNA template (a) and PCR amplified products based on 16S rDNA sequence of the F1 strain (b)

注: a: M, DNA Marker; 泳道 1, 基因组 DNA, b: DNA Marker; 泳道 1, PCR 产物。

扩增产物送交上海生工生物工程有限公司进行测序, 测得该菌株的 16S rDNA 序列的核苷酸序列长度为 1455 bp, 将该序列在 GenBank 上 Blast 比对分析, 通过与近似种属代表株 16S rDNA 序列比对分析构建系统发育树。由图 4 可见, 菌株 F1 与 *Bacillus*

amyloliquefaciens FZB42 进化关系最近, 综合菌体生理生化特征和 16S rDNA 序列分析结果, 将菌株 F1 鉴定为解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*。据报道, *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 是由德国洪德堡大学研究开发出的植物根围促生解淀粉芽孢杆菌, 已经商品化, 商品名为 Rhizo Vital® 42^[16]。研究证实其次生代谢产物表面活性素 surfactin、伊枯草菌素 iturin、芬芥素 fengycin 和杆菌抗霉素 Bacillomycin D 等抗菌物质能起到预防植物病害和抑制植物病原菌作用^[17]。

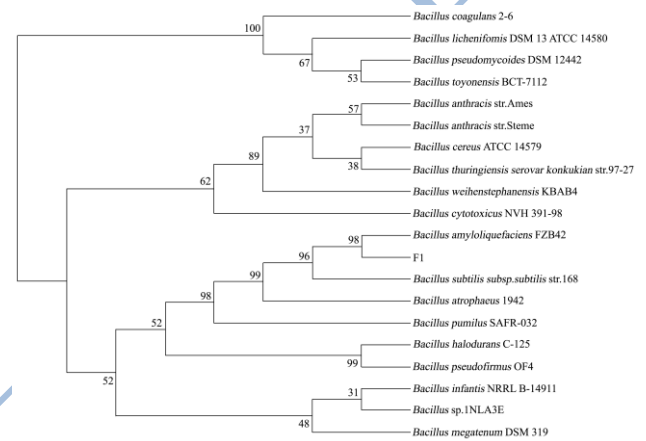


图 4 基于 16S rDNA 序列同源性的 F1 菌株的系统发育树
Fig.4 Phylogenetic tree of the F1 strain based on the 16S rDNA sequence

2.5 菌株 F1 抑菌成分的初步研究

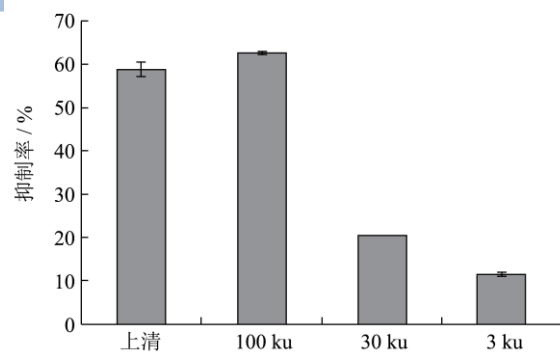


图 5 膜过滤各部分收集液的抑菌率

Fig.5 Antifungal activity of fractions from membrane filtration

分别选取膜截留分子量 100 ku、30 ku 和 3 ku 的超滤膜对菌株 F1 发酵上清液进行超滤, 各部分超滤液的抑菌活性如图 5 所示, 100 ku 滤过液的抑菌活性略高于原上清液的抑菌活性; 30 ku 滤过液和 3 ku 滤过液的抑菌活性分别下降 65.31% 和 80.61%。综上, 菌株 F1 所产抗真菌物质分子量范围在 30 ku~100 ku。为进一步证实该物质是否为蛋白类物质, 分别选用碱性蛋白酶、胰蛋白酶和蛋白酶 K, 以菌株 F1 超滤液 (30 ku~100 ku) 为底物进行酶解后检测其抑菌活性。结果

如表 3 所示, 经过三种蛋白酶处理后, 超滤液 (30 ku~100 ku) 的抑菌活性均出现不同程度的下降, 其中胰蛋白酶处理后的超滤液的抑菌活性下降了 70%, 结果表明, 抗菌超滤液对胰蛋白酶较为敏感, 初步确定 30 ku~100 ku 超滤液中含有能抑制黄曲霉的蛋白类抗菌物质。Wong 等^[12]从解淀粉芽孢杆菌 NK10 中分离纯化得到对多种病菌具有抑制活性的抑菌蛋白 baciamin, 分子质量为 50 ku, 可通过增加病原真菌的膜通透性而达到抑制其生长的作用。Kim 等^[13]通过 30% 硫酸铵沉淀、Centricon 10 浓缩、DE-AE 琼脂糖柱及 Sephacryl S-100 凝胶过滤层析从解淀粉芽孢杆菌 MET0908 发酵液中分离得到分子量为 40 ku 的产生的抗真菌蛋白。上述研究从解淀粉芽孢杆菌中获得的抑菌蛋白的分子量与本研究抗菌蛋白分子量大小较为接近, 均为分子量较高的抗真菌蛋白。

表 4 酸碱、热和酶处理对抑菌活性的影响

Table 4 Effect of acid-base, heating, and enzymatic treatments on the antifungal activity

处理方式	相对抑菌活性/%	处理方式	相对抑菌活性/%
抗菌超滤液(对照)	100	pH 3.0, 30 min	70.06
碱性蛋白酶	85.03	pH 4.0, 30 min	74.85
胰蛋白酶	30.09	pH 5.0, 30 min	99.55
蛋白酶 K	60.78	pH 6.0, 30 min	98.05
30 °C, 30 min	100	pH 7.0, 30 min	90.27
50 °C, 30 min	97.46	pH 8.0, 30 min	87.43
70 °C, 30 min	99.85	pH 9.0, 30 min	83.38
100 °C, 30 min	87.43	pH 10.0, 30 min	76.05
121 °C, 30 min	60.18		

进一步的研究如表 4 所示, 在温度 50 °C~70 °C 范围内, 抗菌超滤液对黄曲霉的抑菌活性变化不显著 ($P \geq 0.05$); 当抗菌超滤液温度高于 70 °C 时, 随着温度的升高, 其对黄曲霉的抑菌活性显著下降 ($P < 0.05$), 但在 100 °C 处理 30 min 后仍能保持 87.43% 的抑菌活性, 121 °C 高温处理 30 min 后仍保留 60.18% 的抑菌活性; 在 pH 值 3.0~10.0 范围内, 相对抗菌活性均在 70% 以上, 而在 pH 值 5.0~9.0 范围内, 其相对抗菌活性均在 80% 以上。研究结果表明, 菌株 F1 所产抗真菌蛋白具有较强的热稳定性和 pH 稳定性。

3 结论

从收集的样品中分离到 223 株细菌, 其中 80 株细菌来源于香辛料, 143 株乳酸细菌来自于泡菜、酸奶和火腿。经初步筛选, 223 株细菌中分离筛选到对黄曲霉有较强抑制作用的菌株 31 株, 其中 9 株来自于

香辛料分离菌, 且全部为产芽孢杆菌, 另外 22 株主要为来自泡菜母水和香肠中的乳酸菌; 对抑菌效果较好的香辛料来源的 9 株细菌进行复筛并最终筛选到一株能强烈抑制黄曲霉生长的菌株 F1, 分离来源为黑胡椒, 经生理生化和分子生物学方法鉴定为解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*, 与已商品化的生防菌 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 的亲缘关系最为接近。菌株 F1 经发酵培养后, 收集发酵上清液并经过超滤处理和蛋白酶酶解试验, 抑菌实验证实, F1 的发酵液中含有分子量在 30~100 ku 范围内的抗真菌蛋白, 其具有较强的热稳定性和 pH 稳定性。

参考文献

- [1] Klich M A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8(6): 713-722
- [2] Yu J, Cleveland TE, Nierman WC, et al. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases [J]. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2005, 22(4): 194-202
- [3] 王后苗, 廖伯寿, 雷永, 等. 黄曲霉菌主要真菌毒素次级代谢与调控的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(7): 1425-1438
WANG Hou-miao, LIAO Bo-shou, LEI Yong, et al. Progresses on research of secondary metabolite and regulation of primary mycotoxins in *aspergillus flavus* [J]. *Microbiology China*, 2014, 41(7): 1425-1438
- [4] Khlangwiset P, Shephard G S, Wu F. Aflatoxins and growth impairment: a review [J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2011, 41(9): 740-755
- [5] Rodrigues I, Naehrer K. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feed stuffs and feed [J]. *Toxins*, 2012, 4(9): 663-675
- [6] Strosnider H, Azziz-Baumgartner E, Banziger M, et al. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries [J]. *Environment Health Perspect*, 2006, 114(12): 1898-1903
- [7] 白凤翎, 励建荣. 抗真菌性乳酸菌生物保护剂的研究进展[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(5): 311-319
BAI Feng-ling, LI Jian-rong. Advanced Research on Antifungal *Lactic acid bacteria* of Food Bio-protective Agent [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(5): 311-319
- [8] Gourama H, Bullerman L B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feed: A review [J]. *Journal of Food Protection*, 1995, 58(12): 1395-1404

- [9] 马镛,徐匆,张长勇,等.一株荔枝生物保鲜乳酸菌的筛选及鉴定[J].现代食品科技,2014,30(5):111-117
MA Ke, XU Cong, ZHANG Chang-yong, et al. Screening and Identification of a Lactic acid bacteria Strain With Lychee Fresh-keeping Function [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 111-117
- [10] 张娟,杨彩梅,曹广添,等.解淀粉芽孢杆菌及其作为益生菌的应用[J].动物营养学报,2014,26(4):863-867
ZHANG Juan, YANG Cai-mei, CAO Guang-tian, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* and Its Application as a Probiotic [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(4): 863-867
- [11] 陈成,崔堂兵,于平儒.一株抗真菌的解淀粉芽孢杆菌的鉴定及其抗菌性研究[J].现代食品科技,2011, 27(1): 36-39
CHEN Cheng, CUI Tang-bing, YU Ping-ru. Identification of an anti-fungal strain of *amyloliquefaciens bacillus* and the properties of the antifungal substance [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(1): 36-39
- [12] Wong J H, Hao J, Cao Z, et al. An antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 105(6): 1888-1898
- [13] Kim P, Chung K C. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908 [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 234(1): 177-183
- [14] Yuan J, Raza W, Shen Q R, et al. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5942-5944
- [15] Kadaikunnan S, Rejiniemon T S, Khaled J M, et al. *In-vitro* antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2015, 14:9 doi:10.1186/s12941-015-0069-1
- [16] Idris E E, Bochow H, Ross H, et al. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent.VI. Phytohormonelike action of culture filtrates prepared from plant growthpromoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37 [J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2004, 111(6): 583-597
- [17] Chen X H, Vater J, Piel J, et al. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(11): 4024-4036